



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Programmed cell death in plants and caspase-like activities**

Gaussand, G.M.D.J.

### **Citation**

Gaussand, G. M. D. J. (2007, April 25). *Programmed cell death in plants and caspase-like activities*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11864>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/11864>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).





## **Samenvatting**



Bij de ontwikkeling van multicellulaire organismen speelt de balans tussen celgroei, celdeling en celdood een belangrijke rol. Bij dieren speelt geprogrammeerde celdood (PCD) een centrale rol bij het vormen en het verwijderen van structuren, het beheersen van het aantal cellen en het elimineren van beschadigde cellen. Apoptose is een genetisch bepaalde en morfologisch herkenbare vorm van PCD, gedefinieerd door samentrekking van de celkern en het cytoplasma, door verbinding van het chromatine met de nucleaire periferie, DNA fragmentatie, door membraan “blebbing” en door het opnemen en lysosomale afbraak van de stervende cel door een fagocyt. Van caspases is ontdekt dat zij de apoptose uitvoeren, en van bepaalde eiwitten van de mitochondria, zoals van de IAP- en de Bcl-2-familie, is ontdekt dat zij de apoptose regelen.

Bij planten speelt PCD een belangrijke rol bij de ontwikkeling en bij de reacties op pathogenen en abiotische stress. Sommige gemeenschappelijke kenmerken van apoptose blijken te zijn bewaard in zowel planten als dieren. Enkele van die kenmerken zijn het krimpen van het cytoplasma, het lekken van cytochrome c uit mitochondria, chromatine condensatie, verandering van nucleaire morfologie, DNA-fragmentatie in grote fragmenten en “laddering” van DNA. Nadat de volledige sequenties van plantgenomen zoals die van *Arabidopsis* en rijst volledig in kaart gebracht waren, werd het duidelijk dat er voor de caspases of voor de apoptotische regulators van de IAP- en Bcl2-families geen genen aanwezig zijn in planten. Echter, van dierlijke Bcl2-leden is vast komen te staan dat zij celdoodprocessen in planten kunnen beïnvloeden. Dit impliceert dat een vergelijkbare apoptotische regulatie nog steeds aanwezig kan zijn in planten.

De in dit proefschrift beschreven studies zijn gericht op de bepaling van het bestaan van caspase-achtige activiteiten in planten gedurende PCD. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift is de *Arabidopsis* spontane necrotische vlekkenmutant (*sns*), die bij ontwikkeling necrotische vlekken ontwikkelt, beschreven. Zowel het T-DNA als de binaire vector zijn ingebouwd in de 3'UTR van het gen *Atlg13020*. Dit gen codeert voor een vermoedelijke eukaryotische translatie initiatiefactor, eIF4B5. De integratie resulteerde in een chromosomale hergroepering en veroorzaakte daardoor veranderingen in de expressie van verscheidene genen rondom de plaats van het insert. Necrotische vlekken worden zichtbaar op de bladeren na twee of drie weken van groei, hetgeen lijkt op de kneuzingen die gepaard gaan met de overgevoeligheds reactie na een pathogene aanval. Het fenotype van de *sns*-mutantplanten is gedetailleerd geanalyseerd. Door het gebruik van een TUNEL-analyse is DNA-fragmentatie gevonden in de kernen van cellen in de necrotische vlekken. Verder is er een significante toename van caspase-3 en -6-achtige activiteiten gevonden in *sns*-bladextracten. Dit wijst erop dat de mutatie plaatselijke celdood door PCD veroorzaakt.

Aangezien het plaatsbepaalde celdoodproces een belangrijke stap leek te zijn in de toewijding van microsporen aan de embryogenetische route, is dit proces in detail gekarakteriseerd in **hoofdstuk 3**. Morfologische analyse heeft uitgewezen dat deze pro-embryo's zijn samengesteld uit twee verschillende cellulaire domeinen: een groot vegetatief domein en een klein generatief domein die zich bevinden aan de overzijde van het pollen kiemspoor. Gedurende de overgang van multicellulaire structuren naar globulaire embryo's stierf het generatieve celdomein door een proces van PCD. Hoofdkenmerken van geprogrammeerde celdood zoals chromatine samentrekking, uiteenvallen van DNA en activiteitstoename bij caspase-3-achtige proteases gingen vooraf aan grootschalig celsterven van het generatieve celdomein. Na eliminatie van het kleine generatieve domein door PCD ontstond verdere embryogenese uitsluitend door het grote vegetatieve domein. Deze resultaten tonen aan dat geprogrammeerde celdood een belangrijk aspect is van het embryogenetische traject van microsporen van gerst.

**Hoofdstuk 4** beschrijft een rijst-cel-suspensie-systeem. Om de ontwikkeling van necrose en geprogrammeerde celdood (PCD) in dit systeem te bestuderen is een temperatuur-schok-behandeling gebruikt. Caspase-achtige activiteiten zijn twintig uur na de aanvankelijke temperatuurschok gemeten, gevolgd door degradatie van het DNA. De toename van de caspase-achtige activiteiten correleerde met de toename van celdood. De toevoeging van caspase-3- en caspase-6-remmers remde caspase-3 en caspase-6-activiteiten. Deze remmers gingen DNA-degradatie of celdood echter niet tegen. De rijst-suspensie-cellen kunnen op grote schaal gekweekt worden voor zuiveringsdoeleinden.

Gedurende het onderzoek van dit proefschrift hebben andere onderzoekers ook ontdekt dat caspase-achtige activiteit aan PCD gerelateerd was. Indien caspase-achtige activiteiten in plantenextracten tijdens PCD gemeten kunnen worden, is dat een sterke aanwijzing dat caspase-achtige proteasen betrokken zijn bij planten-PCD. Caspase-achtige activiteiten in plantenextracten kunnen worden ontdekt met behulp van een fluorogeen caspase-substraat van dierlijke origine dat de caspase-substraat herkenningsplaatsen imiteert. Tijdens de reactie wordt het fluorescerende deel van het fluorescerende substraat afgeknipt na het aspartaat residu (bijvoorbeeld -AMC van het caspase-3-substraat Ac-DEVD-AMC). Om na te gaan of het knippen geschiedt door een gewone cysteïne protease-activiteit of door specifieke caspase-achtige eiwitten kan een specifieke caspaseremmer van dierlijke origine worden gebruikt. Teneinde het humane caspase-3 te zuiveren, is avidine-biotine-affiniteitschromatografie gebruikt in combinatie met de gebiotinyleerde caspaseremmer biotin-DEVD-CHO. Deze remmer was ontworpen op basis van het natuurlijke caspase-3-substraat, poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Met gebruikmaking van dezelfde technologie zou caspase-3-achtige activiteit mogelijk uit plantenextracten gezuiverd kunnen

worden. In **hoofdstuk 5** is de ontwikkeling en implementatie beschreven van het protocol om plantencaspase-3-achtige activiteit te zuiveren. De rijst-suspensie-cellen zijn op grote schaal gecultiveerd. Dezelfde gebiotinyleerde humane caspase-3-blokkeerder, biotin-DEVD-CHO, is gebruikt om de plantenprotease te zuiveren. Het enige eiwit dat is geïdentificeerd, is de koper chaperone homolog CCH. In dit hoofdstuk worden de mogelijke rollen van de koper chaperone homolog CCH bij PCD in planten besproken. Het eiwit, de caspase-achtige protease, is echter niet geïdentificeerd. Hoewel de opbrengst van de affiniteitschromatografiestap tamelijk laag was, konden sommige eiwitten specifiek geëluëerd worden. Deze eiwitten werden geanalyseerd met LC-MS/MS-analyse, gevolgd door een database-zoekactie. Met deze methode konden verscheidene proteïnen niet geïdentificeerd worden. Dit resultaat doet veronderstellen ofwel (i) dat de methode niet optimaal was, (ii) of dat de plantenprotease onderdeel zou kunnen zijn van een eiwit-complex, of (iii) dat de affiniteit van de plantenprotease voor de gebiotinyleerde remmer niet zo sterk was.

Een ander punt om hier te bespreken is de verklaring van waarom CCH met deze methode gezuiverd is. Een mogelijkheid is natuurlijk dat het deel uitmaakt van een bij PCD betrokken complex. Een andere mogelijkheid is dat de binding van het chaperone aan biotin-DEVD-CHO een artefact is. De CCH behoort tot een familie van 31 eiwitten die een zware-metalen-geassocieerd (HMA) domein bezitten dat verwant is aan het ATX1 HMA-domein van gist. Deze eiwitten hebben een geconserveerd HMA-domein van ongeveer 30 aminozuur residuen. Het HMA-domein bevat twee cysteïne residuen die belangrijk zijn voor het binden en transporteren van metaalionen, zoals koper, cadmium, kobalt en zink. In het geval van koper is er stoichiometrisch één  $\text{Cu}^+$ -ion per bindend domein. CCH bevat de metaal bindende sequentie MXCXGC die aanwezig is in dit type koper chaperones van planten, gisten en dieren. Het is mogelijk dat biotin-DEVD-CHO bond aan deze sequentie. De katalytische activiteit van caspases wordt inderdaad gemedieerd door een catalytische dyade, bestaande uit Cys163 en His121. De substraatbindende opening herkent een korte sequentie van 4 aminozuren in eiwitsubstraten, die direct N-terminal ligt voor de knipplaats. Dit tetrapeptide is voldoende om specifiek te binden aan de actieve caspase, en dit vormt de basis voor het ontwerp van de synthetische remmers, zoals Ac-DEVD-CHO of biotin-DEVD-CHO.

Recente experimenten die erop gericht waren om de proteases verantwoordelijk voor de caspase-achtige activiteiten in plantencellen te zuiveren en karakteriseren, hebben uitgewezen dat serine proteasen en vacuolaire cysteïne proteasen mogelijk de caspase-achtige activiteiten in planten-PCD veroorzaken. In de betreffende onderzoeken is men met vergelijkbare problemen met de gebiotinyleerde substraten en remmers geconfronteerd. Coffeen en Wolpert hadden bijvoorbeeld geen succes met het aantonen van een protease activiteit die verkregen was na scheiding op een HIC-kolom met de gebiotinyleerde remmer

biotin-VAD-FMK. Zij stelden vast dat biotin-VAD-FMK Z-VAD-AFC-hydrolyse remde, maar het eiwit niet covalent bond. Zelfs na succesvolle zuivering van een eiwit met behulp van caspase-remmer tags dient nog bewezen te worden dat de activiteit betrokken is bij PCD, omdat de remmers mogelijk niet specifiek zijn voor alleen het planten caspase achtige eiwit.

Hoewel caspase-achtige activiteiten betrokken lijken te zijn bij planten-PCD, was het duidelijk dat orthologen van de dierlijke genen voor caspases niet aanwezig zijn in planten. In de zoektocht naar de proteases die betrokken zijn bij planten-PCD zijn andere eiwitten ontdekt en beschreven als mogelijke actoren in planten-PCD. Er is een familie ontdekt van verre verwanten van caspase-achtige proteasen - metacaspases genoemd - in planten, schimmels en Plasmodium. Er wordt vermoedt dat metacaspases een rol spelen bij PCD. De mRNA concentraties van LeMCA1 - een tomaat (*Lycopersicon esculentum*) type II metacaspase - nemen toe na besmetting van bladeren met het schimmelpathogeen *Botrytis cinerea*. Deze toename correleert met de vorming van primaire necrotische aantastingen. Het eiwit mclI-Pa (plantenmetacaspase type II) komt gedurende PCD tot expressie tijdens de somatische embryogenese van Noorse spar. *In situ* hybridisatie-analyse toonde mRNA-opeenhoping in het deel van de embryogene weefsels en structuren welke zijn gedoemd om af te sterven. De activatie van proteasen die het caspase-6-substraat knippen (VEIDase-activiteit) is essentieel voor PCD en embryogenese in de Noorse spar (*Picea abies*). Het tot zwijgen brengen van het *P. abies* metacaspase gen *mclI-Pa* blokkeerde VEIDase-activiteit, onderdrukte PCD in de embryo's en belette suspensor differentiatie. Immunolokalisatie-analyses en functionele analyses toonden aan dat mclI-Pa zich ophoopt in de kernen van de suspensorcellen en dat het direct betrokken is bij de nucleaire deassemblage. Twee type I metacaspases komen in Arabidopsis-planten hoger tot expressie na infiltratie met een bacterieel pathogeen. De vacuolair verwerkende enzymen (VPE's) bevorderen de maturatie en de activering van verscheidene vacuolaire eiwitten in planten. Recente gegevens suggereren dat VPE's sleutelfactoren kunnen zijn in vacuolair -gestarte celdood. Er bestaat geen verwantschap in sequentie tussen VPE's en caspases. Toch hebben VPE's een proteolytische activiteit gericht op een caspase-1 substraat, en VPE-activiteit wordt geblokkeerd door een caspase-1-remmer. Tabaks-VPE vertoont de caspase-1-achtige activiteit die vereist is voor de celdood als gevolg van TMV geïnduceerde HR in tabak. De saspasen-A en -B, behorend tot de substilisin-achtige seriene protease-familie, zijn betrokken bij door victorine geïnduceerde PCD in haver (*Avena sativa*). Zij breken caspase-specifieke substraten af en worden geremd door caspase-specifieke remmers. De twee haver-saspases kunnen caspase-6, -8 en -9-substraten afbreken, maar niet DEVD en VEID.

De laatste jaren is de kennis met betrekking tot de cellulaire en moleculaire aspecten van PCD in zowel dieren als planten enorm toegenomen. De vraag "Bestaan er

plantencaspases?" is al lang geleden gesteld. Dat was toen al een goede vraag en het is vandaag de dag nog immer een goede vraag. Als er inderdaad een plantencaspase-achtige protease bestaat, zou dat het zoals in dieren een cysteine protease kunnen zijn dat eiwitten knipt naast aspartate residuen. Tegenwoordig stapelt het bewijs zich op dat plantencaspase-achtige proteases bestaan, aangezien caspase-achtige proteolytische activiteit aanwezig is in planten en deze activiteit een centrale rol speelt in planten-PCD. Maar de voornaamste plantaardige uitvoerder van planten PCD is nog onbekend.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft een aanzienlijke bijdrage geleverd aan het begrijpen van de rol van caspase-achtige proteases bij planten-PCD. Het optimaliseren van een protocol om caspase-achtige activiteit te meten, van de extractiebuffer en van het zuiveringsprotocol zijn cruciaal geweest in dit onderzoek. Verder vormen de verschillende plantensystemen die zijn geanalyseerd in dit proefschrift nuttige hulpmiddelen voor verdere analyse van PCD. De identificatie van voor PCD verantwoordelijke proteases is essentieel om het moleculaire mechanisme bloot te leggen dat ten grondslag ligt aan PCD in planten, en om inzicht te geven in de verschillen tussen planten- en dieren-PCD. Het zou opwindend zijn om die proteasen te ontdekken.



